体外診断用医薬品　　　　　　　　　　　**2009 年 11 月改訂
製品番号 IM1295U　　　　　　　　　　*2008 年 1 月改訂
承認番号 20700AMY00076000

日本標準商品分類番号
877449

クラスⅡ免疫検査用シリーズ

T 細胞キット／T 細胞サブセットキット

Dual Color Kit「イムノテック」 CD3/HLA-DR

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. Dual Color Kit「イムノテック」は、フローサイトメトリー用です。ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（キットの構成）

構成試薬名	成分	分量（1 回測定分）
標準抗体液	FITC 標識 CD3 マウスモノクローナル抗体 IgG 画分	2.0μL/検体※
	PE 標識抗 HLA-DR マウスモノクローナル抗体 IgG 画分	0.02μL/検体※
溶血液（別売）		
固定液（別売）		

※IgG濃度としては 0.9～1.1mg/mL

使用目的

細胞表面抗原 CD3 及び HLA-DR（CD3 抗原陽性細胞及び HLA-DR 抗原陽性細胞）の測定

測定原理

測定方法は、フローサイトメトリーを用いた２カラー直接免疫蛍光法です。細胞に FITC（緑色蛍光色素）で標識した抗体と PE（オレンジ色蛍光色素）で標識した抗体を同時に反応させ、フローサイトメーターを用いて各抗体の陽性細胞の計測を行います。

操作上の注意

1. Dual Color Kit「イムノテック」は、フローサイトメトリー用です。
2. 抗凝固剤として EDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれの場合も採血後は室温で保存します。
3. 長時間（概ね採血後 6 時間以上）検体を保存する場合は、検体の安定性についてあらかじめ検討してください。
4. 溶血不良となるおそれがあるため、血液を試験管に分注する際は試験管の上部壁面に血液を付けないよう注意してください。付着した血液は、綿棒等で取り除いてください。
5. 有核赤血球、蛋白濃度が異常な場合、ヘモグロビン合成異常等では、赤血球の溶血が不完全となる場合があります。この場合、溶血していない赤血球をリンパ球としてカウントするために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあります。
6. 溶血時間が長すぎると白血球にも影響が及ぶことがあります。
7. Ficoll-Paque 分離液による単核細胞の比重遠心分離に伴い、リンパ球中の特定のサブセットが選択的に失われることがあります。
8. フローサイトメーターの調整不良、感度やゲート等の不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
9. サンプル調製方法や試薬、フローサイトメーターの機種や測定条件などの違いにより測定値が影響を受けるおそれがあるため、基準値は施設ごとに設定してください。
10. 各々の白血球細胞群の変動は必ずしも病態と一致するとは限らないため、測定結果は臨床所見及び他の検査データと共に使用してください。
11. 測定結果の解釈を行う場合には、測定条件及び供血者の年令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮してください。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用できます（20μL／テスト）。

溶血試薬（VersaLyse 溶血試薬、製品番号 A09777）【別売】

溶血試薬は、そのまま使用できます。1テストにつき溶血試薬1mLを使用します。

固定試薬（IO Test 3 固定試薬、製品番号 A07800）【別売】

PBS（下記） 1mL に対し IO Test 3 固定試薬 12.5μL の割合で希釈します（0.1%ホルムアルデヒド加 PBS）。IO Test 3 固定試薬は、ホルムアルデヒドを 8%含有しているため、取り扱いに注意してください（医薬用外劇物）。
他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の取扱説明書に従ってください。

【その他に必要な試薬】

1. PBS（リン酸緩衝生理食塩水）
   PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。ウシ血清アルブミン（BSA、0.5%）やアジ化ナトリウム（0.1%）等を添加したのものも使用可能です。
2. コントロール試薬（アイソタイプ・コントロール抗体）
   IO Test IgG1-FITC/IgG1-PE 製品番号 A07794 容量 50 テスト（1mL）
3. Ficoll-Paque 分離液
   Pharmacia カタログ番号 17-0840-03 または相当品を使用します。

1. 全血サンプルを検体とする場合（全血法）

【検体の採取と調製】

試験管 1 本につき 100μL の血液を必要とします。

抗体の染色に最適な白血球数が5×10^3個/mm^{3}であるため、白血球数が10×10^3個/mm^{3}を超える場合は、PBSで検体を希釈し、3×10^3/mm^{3}より少ない場合には、以下の手順で白血球を濃縮します。

白血球濃縮方法（バフィーコート回収法）

（1）検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心分離します。
（2）白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
（3）数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4）コールターLH 700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて白血球数を測定します。
（5）PBSで白血球数を 5～10×10^3個/mm^{3}の範囲に調整します。

【染色操作法】

（1） 抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
（2） 各々の試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ってください。
（3） モノクローナル抗体試薬 20μL を反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、コントロール試薬（IO Test IgG1-FITC/IgG1-PE、別売）を 20μL 加えます。
（4） よく撹拌し、室温、暗所で 15～20 分間反応させます。
（5） 赤血球を溶血させます。VersaLyse 溶血試薬の場合、溶血試薬を 1mL 加えてよく撹拌し、室温で 10 分放置します。
（6） 400×g、5分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
（7） PBS を 3mL 加えて撹拌します。
（8） 400×g、3 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
（9） 適量（0.5～1mL）の PBS を加え、よく撹拌します。調製後のサンプルはアイスバス中で遮光保存し、2 時間以内に測定します。サンプルを保存する場合は、0.5%ホルムアルデヒド加 PBS に再浮遊し、24 時間以内に測定します。

（10） フローサイトメーターでリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。

2. Ficoll-Paque 分離単核細胞を検体とする場合

【検体の採取と調製】

（1） 試験管に血液（抗凝固剤を含む）を3～4mL 取り、ほぼ等量 PBSを加え、転倒混和します。
（2） 別の試験管に Ficoll-Paque 分離液を 4mL 入れ、その上に（1）の希釈血液を重層します。
（3） 2～8℃で 400×g（分離液により異なる）、30 分間遠心分離します。
（4） Ficoll-Paque 分離液と血漿の間の層（単核球層）をパスツールピペットで取り、別の試験管に移します。
（5） PBS を加えて撹拌し、2～8℃で 400×g、8 分間遠心分離します。
（6） 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく撹拌します。
（7） 2～8℃で 400×g、4 分間遠心分離します。
（8） 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく撹拌します。
（9） 2～8℃で 400×g、3 分間遠心分離します。
（10）上清を吸引除去し、沈渣にPBSを加えて細胞濃度を 5×10^3個/mm^3（5×10^6個/mL）に調整します。
（11） トリパンブルー等で、細胞のバイアビリティ（生残率）をチェックします。バイアビリティは 90%以上が適当ですが、検体によってはこれを下回ることがあります。

【染色操作法】

（1） 抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
（2） 各々の試験管にFicoll-Paque調製サンプルを 5×10^5個（細胞濃度が 5×10^6個/mLの場合 100μL）ずつ分注します。
（3） モノクローナル抗体試薬 20μL を反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、コントロール試薬（IO Test IgG1-FITC/IgG2a-PE、別売）を 20μL 加えます。
（4） よく撹拌し、室温、暗所で 15～20 分間反応させます。
（5） PBS を 3mL 加えて撹拌します。
（6） 2～8℃で 400×g、5 分間遠心分離し、上清を吸引除去します。
（7） （5）～（6）の操作を繰り返します。
（8） 適量（0.5～1mL）の PBS を加え、よく撹拌します。調製後のサンプルはアイスバス中で遮光保存し、2 時間以内に測定します。サンプルを保存する場合は、0.5%ホルムアルデヒド加 PBS に再浮遊し、24 時間以内に測定します。
（9） フローサイトメーターでリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。

測定結果の判定方法

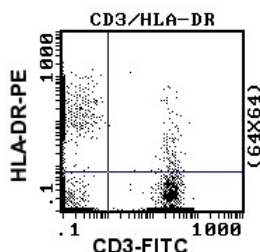
フローサイトメーターによる測定

使用するフローサイトメーターは、あらかじめ蛍光のコンペンセーション（FITC と PE の蛍光波長のオーバーラップ分の補正）が適切に設定されている必要があります。コンペンセーションは測定前に必ず確認し、測定中もレーザ光軸の再調整や PMT ハイボルテージの再設定等を行った際には修正、確認する必要があります。詳細は機器取扱説明書をご参照ください。

前方散乱光（FS）と側方（90° 方向）散乱光（SS）によるスキャッタ・サイトグラム上でリンパ球領域にゲートをかけることにより、自動的にリンパ球のみの解析ができます。解析細胞数を数千個以上とることで、精度の良い分析結果が得られます。

データ解析は、FITC 蛍光（Log スケール）及び PE 蛍光（Log スケール）の 2 パラメータ蛍光ヒストグラムで行います。蛍光陽性分画のカーソルは、コントロール試薬で同様に染色処理したサンプルを対照として設定します。通常は、コントロール試薬の陽性率が 2%以下になるようにカーソル位置を設定しますが、腫瘍検体などでは設定が困難なことがあります。コントロール試薬において Quadrant 1、2、4 のいずれかが 2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがあります。

図. ヒストグラム例（全血法、EPICS XL でリンパ球領域を解析）

IM1295U

測定条件の確認

測定条件が正しいかどうかを確認するには、CYTO-TROL（精度管理用陽性コントロール細胞、製品番号 6604248）または健常者検体を陽性コントロール検体として測定します。

リンパ球サブセット分析の場合、Fcレセプタを介した単球や顆粒球に対する非特異結合は、リンパ球領域を正しくゲーティングすることで除外できます。検体ごとにリンパ球ゲート確認用抗体試薬（IO Test CD45-FITC/CD14-PE、製品番号 A07738）を測定することで、単球を含まない正しいリンパ球領域のゲーティングが可能です。

各検体のリンパ球に対する非特異的な抗体の Fc 結合を確認するために、陰性対照には適切なコントロール試薬（IO Test アイソタイプ・コントロール抗体）を使用してください。

臨床的意義

T 細胞及び活性化 T 細胞の定量ができます。自己免疫疾患や感染症などのモニタリングや白血病及びリンパ腫の分類などに有用です。

性能

【特異性】

本試薬を用いて JURKAT 細胞（1）を検体として測定したとき、CD3 抗原の陽性細胞率及び HLA-DR の陽性細胞率はそれぞれ 95%以上、0.5%以下でした。また、Raji 細胞（2）を検体として測定するとき、CD3 抗原の陽性細胞率及び HLA-DR の陽性細胞率はそれぞれ 0.5%以下、95%以上でした。

（1）JURKAT 細胞:T-cell Leukemia 由来培養細胞株
（2）Raji 細胞:Burkitt lymphoma 由来培養細胞株

【感度】

本試薬を PBS にて 4 倍希釈し、JURKAT 細胞、Raji 細胞及び健常人検体 3 例を測定したときの、CD3 抗原、HLA-DR の陽性細胞率は本試薬をそのまま用いて測定した場合の±10%範囲内でした。

【再現性】

本試薬を用いて健常人検体 3 例を 5 回同時に測定した場合の CD3 抗原、HLA-DR の陽性細胞率の変動係数は 5%以内でした。

【既承認品との相関性】

末梢血 50 検体について、Dual Color Kit「イムノテック」と既承認の抗体試薬との相関性を調べた結果は、以下のとおり非常に良好でした。

CD3/HLA-DR（CD3+ HLA-DR+ 陽性率）:
回帰直線 $y = 0.93x + 1.40$ 相関係数 $r = 0.971$

使用上または取扱上の注意

1. 本製品は、アジ化ナトリウムを 0.1%含有しています。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生するため、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物の金属性の排水管内への蓄積による爆発の危険性を避けるため、廃棄は多量の流水で希釈して行ってください。
2. 試薬を凍結保存しないでください。
3. 試薬の外観に変化がみられたり、コントロール検体の測定値に大きな変化がある場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。
4. 使用期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
5. 未開封の試薬は、遮光、冷蔵（2～8℃）で保存した場合に各バイアルに明記してある有効期限まで使用できます。
6. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示及び処理をした後に廃棄してください。
7. 皮膚や粘膜に検体や試薬が触れないように注意してください。ピペットを口で吸引しないでください。
8. 保管やインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
9. 試薬が微生物に汚染されないようご注意ください。

貯法方法・有効期間

Dual Color Kit「イムノテック」 CD3 /HLA-DR
:2〜8℃保存　製造後 12 箇月

溶血試薬（VersaLyse 溶血試薬、製品番号 A09777）
:室温保存　　製造後 30 箇月、開栓後 90 日

固定試薬（IO Test 3 固定試薬、製品番号 A07800）
:2〜8℃保存　製造後 12 箇月、開栓後 90 日

包装単位

Dual Color Kit「イムノテック」 CD3 /HLA-DR
:製品番号 IM1295U　容量 50 テスト（1mL）

溶血試薬（VersaLyse 溶血試薬）
:製品番号 A09777　容量 100mL

固定試薬（IO Test 3 固定試薬）
:製品番号 A07800　容量 10mL

主要文献

1. McMichael AJ, ed: 1987. Leukocyte a Typing. Oxford University Press. pp. 144-147, 239-241, 889-895.
2. Knapp W. et al., ed: 1989. Leukocyte a Typing. Oxford University Press. pp. 342-343.
3. Beverly PCL and Callard RE. : 1981. Eur.J.Immunol 11: 329-334.
4. Bryan CF, Newman, JT, et al.: 1987. Trans. Proc. 19: 4340-4344.
5. Clark P, Normansell DE, et al.: 1987. Blood 67: 1600-1606.
6. Clevers H, Dunlap S and Terhost C: 1988. Eur.J. Immunol. 18: 705-710.
7. Freedman AS and Nadler LM: 1987. Semin. Oncol. 14: 193-212.
8. Foon KA and Todd RF: 1986. Blood 68: 1-31.
9. Koepke JA and Landay AL: 1989. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.
10. Kung P, Goldstein G, et al.: 1979. Science 206: 347-349.
11. Lanier LL, Le AM, et al.: 1983. J.Immunol. 131: 1789-1796.
12. Lum LG, 1987. Blood 69: 369-380.
13. Maissen B, Rebai N, et al.: 1982. Eur.J.Immunol. 12: 739-747.
14. Nadler LM, Anderson KC, et al.: 1983. J.Immunol. 131: 244-250.
15. Polk B, Fox R, et al.: 1987. New Engl. J. Med. 316: 61-66.
16. Rebai N, Maissen B, et al.: 1982. Eur.J.Immunol. 13: 106-111.
17. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. Cell 19: 821-827.
18. Reynolds CW and Ortaldo JR: 1987. Immunology Today. 8: 172-174.
19. Spits, et al.: 1985. Eur.J.Immunol. 15: 88-91.
20. Tucher GC, Aoyama H, et al.: 1984. Cell Diff. 14: 223-230.
21. Zola H: 1987. Immunology Today 8: 308-315.

**問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー
TEL：0120-566-730　FAX：03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063　東京都江東区有明三丁目５番７号　TOC 有明ウエストタワー

製造元

130, avenue de Lattre de Tassigny, B.P. 177
13276 Marseille Cedex 9, France